

公益財団法人 大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」

感染症予防対策への活用に向けた

ウシ早期初乳のウイルス不活化効果に関する検討

柴田ちひろ 加藤真姫子*¹ 伊藤 隆*² 斎藤博之

ウシの分娩直後の初乳には様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある。そこで、食品衛生法により飲用が規制されている分娩後5日以内の早期初乳について、間接接触感染により感染が拡大するインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスに対する不活化効果を検討した。インフルエンザウイルスに対するHI試験では、AH3型についてはHI価80倍とワクチン株由来抗血清に匹敵するような値を示す検体も確認されるほど良好な結果が得られた。一方で、AH1pdm09型とB型については一部の検体でHI価が確認されたものの、AH3型と比較して劣る結果であった。生じた反応性の違いは、試験に供したウイルス量に起因したものであると推察され、手指汚染で想定される少ないウイルス量に対しては十分に効果が期待できるものと考えられた。エンテロウイルスに対する中和試験では、動物試験、細胞培養試験の両法においてそれぞれ死亡率、細胞変性出現率の低下が確認され、エンテロウイルスに対する不活化効果が確認された。今後も他のウイルスに対する効果など検討を重ねたい。

1. はじめに

手指を介して口や鼻に病原体が持ち込まれる間接接触感染は、ウイルス性胃腸炎のみならず、インフルエンザや夏かぜ等の呼吸器ウイルス感染症についても最大の感染要因となっている。予防には手洗いが有効であり、アルコールを主成分とする手指用消毒剤等の製品が多数市販されている。しかし、構造としてエンベロープを持たないなど、これら市販消毒剤の効果が十分には期待できない種類のウイルスも存在する。一方でどのようなウイルスにも効果のある薬剤は手指への侵襲性が強く、日常的な使用には適さない。

ウシの分娩直後の初乳には、様々な病原体に対する抗体や不活化成分が含まれているとの報告がある^{1, 2)}。しかし、分娩後5日以内の早期初乳は食品衛生法により飲用が規制されているため、現状では子ウシに給与される以外は全て廃棄処分されている。そこで、この早期初乳をハンドクリーム等の手指用衛生用品に添加することで、衛生用品にウイルス不活化効果を付加し、間接接触感染の簡便な予防対策として活用

し得る可能性を考えた。今回、間接接触感染によって感染が拡大するインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスに対するウシ早期初乳のウイルス不活化効果について検討したので報告する。

2. 方法

2.1 対象検体

平成23年10月～平成25年3月に分娩した秋田県畜産試験場飼養牛17頭、一般酪農農家飼養牛6頭の初乳を対象とした。分娩後24時間を1日として、1～5日目の早期初乳を各日50 mL採取し、検査実施まで-30℃で冷凍保管した。

2.2 前処理

解凍後4,500×g、10分の粗遠心を行い、上層の脂肪分を除去した。その後、再度10,000×g、20分の遠心を行い、中間層の乳清を孔径0.45 μmのフィルターでろ過滅菌した。粘性が強くフィルター滅菌が不可能であった乳清については、レンネット処理を行い、その上清を検体とした。

*¹ 秋田県畜産試験場、*² 秋田中央家畜保健衛生所

2.3 ウイルス不活化効果の検討

検討対象ウイルスはインフルエンザウイルスおよびエンテロウイルスとした。インフルエンザウイルスは赤血球凝集抑制試験（HI 試験），エンテロウイルスはマウスと培養細胞を用いた中和試験により検討した。

2.3.1 インフルエンザウイルス不活化効果の検討

HI 試験の前処理として、乳清検体に対して RDE 処理とモルモット血球を用いた非特異凝集成分の吸収処理を行った。その後、インフルエンザ診断マニュアル³⁾に従い HI 試験を実施した。試験に供したウイルス株は表 1 のとおりである。

表 1 HI 試験に用いたインフルエンザウイルス株

型	株名	2012/2013シーズン ワクチン株由来抗血清 との HI 価
AH3 型	A/Akita/03/2013	640 倍
AH1pdm09 型	A/Akita/05/2013	320 倍
B 型 (Yamagata Lineage)	B/Akita/01/2013	80 倍

2.3.2 エンテロウイルス不活化効果の検討

動物試験および細胞培養試験には、分娩後 1～5 日目の乳清を等量混合し、1 頭分を 1 検体として試験に供した。動物試験は A 群コクサッキーウイルス 10 型、細胞培養試験はエンテロウイルス 71 型を対象に行った。

2.3.2.1 動物試験

1 LD₅₀ (50%致死量) および 10 LD₅₀ に調整したウイルス溶液と乳清とを等量混合して、37℃で 60 分反応させた。その後、1 週齢の乳飲みマウスに反応液 100 μL を接種し、1 週間の観察を行った。なお、本検討は秋田県健康環境センター動物実験管理要綱を遵守し、秋田県健康環境センター動物実験委員会の承認の下で実施した。

2.3.2.2 細胞培養試験

1 TCID₅₀ (50%組織培養感染量) および 10 TCID₅₀ に調整したウイルス溶液と乳清とを 100 μL ずつ等量混合し 37℃で 60 分反応させた。反応後、HEAJ 細胞をシートさせた 48 穴マイクロプレートに反応液全量と維持培地と

して E-MEM 培地 500 μL を添加した。乳清による細胞毒性の影響を除去するため、翌日に維持培地を交換し、細胞変性（CPE）の有無を 1 週間観察した。

3. 結果

3.1 インフルエンザウイルス不活化効果の検討

各型に対する HI 試験結果を図 1 に示す。AH3 型については全ての分娩後 1 日目の検体から HI 価が確認された。分娩後日数の経過と共に HI 価も低下する傾向にあったが、分娩後 5 日目においても 20 検体が HI 価を有していた。一方、AH1pdm09 型については分娩後 1 日目では 14

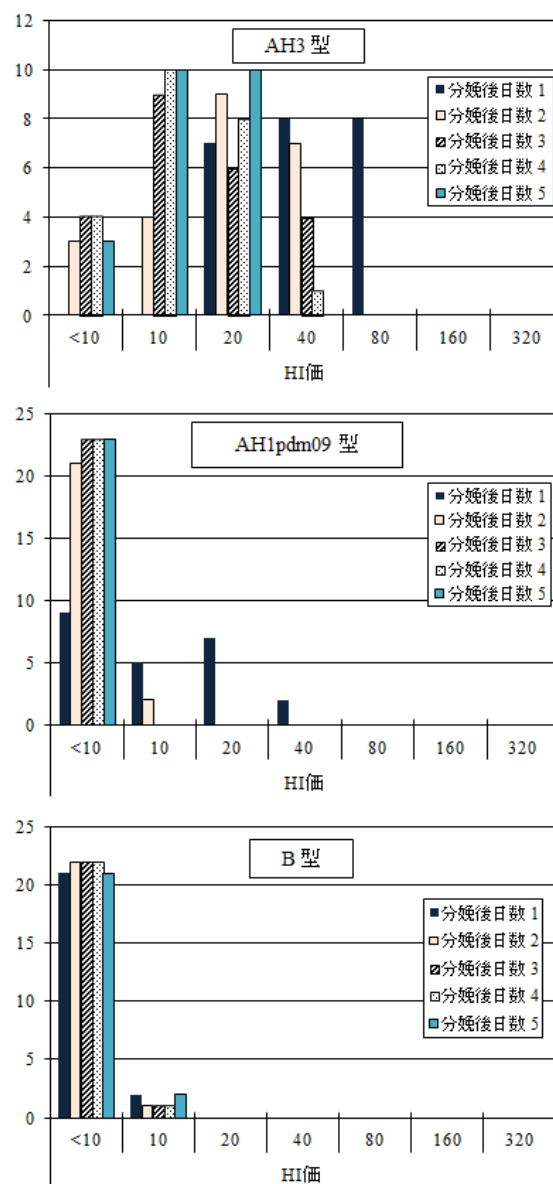


図 1 インフルエンザウイルスに対する HI 試験結果

表2 エンテロウイルスに対する中和試験結果

対象牛		動物試験結果 (死亡数/供試数)				細胞培養試験結果 (CPE出現数/供試数)	
		1 LD ₅₀		10 LD ₅₀		1 TCID ₅₀	10 TCID ₅₀
		対照群	乳清添加群	対照群	乳清添加群	(対照群: 5/8)	(対照群: 7/8)
畜産試験場飼養牛	1	1/4	1/4	2/3	1/3	0/4	0/4
	2	1/3	1/3	2/3	0/3	1/4	1/4
	3	1/3	0/3	1/2	0/3	1/4	1/4
	4	1/3	0/4	2/3	0/3	3/4	4/4
	5	1/4	2/4	2/4	1/4	0/4	0/4
	6	1/4	1/4	3/3	0/3	1/4	1/4
	7	2/4	1/4	4/4	3/4	1/4	3/4
	8	1/4	3/4	4/4	0/4	2/4	2/4
	9	2/4	1/4	4/4	3/4	0/4	1/4
	10	2/4	2/4	4/4	0/4	2/4	3/4
	11	3/4	3/4	4/4	0/4	0/4	2/4
	12	1/4	0/4	3/3	1/3	0/4	1/4
	13	1/3	0/4	3/3	0/3	1/4	3/4
	14	3/4	1/5	3/3	0/4	1/4	3/4
	15	3/4	0/4	3/3	1/3	2/4	3/4
	16	2/4	1/4	3/3	1/4	0/4	1/4
	17	3/4	1/5	3/3	0/3	1/4	3/4
酪農農家飼養牛	18	2/4	0/4	4/4	0/4	2/4	3/4
	19	1/3	0/4	2/3	0/3	0/4	2/4
	20	2/4	0/4	3/4	0/4	0/4	3/4
	21	1/4	0/4	4/4	0/4	2/4	4/4
	22	2/4	0/4	3/3	1/4	0/4	4/4
	23	3/4	0/4	3/3	0/3	2/4	2/4
計		40/87 (46.0%)	18/92 (19.6%)	69/77 (89.6%)	12/81 (14.8%)	22/92 (23.9%)	50/92 (54.3%)

検体が HI 価を示したものの、3 日目以降になると全ての検体が 10 倍未満であった。B 型については、いずれかの日数で HI 価が確認されたのは 4 頭のみであり、残り 19 頭は全日数をとおして HI 価 10 倍未満であった。また、4 頭 7 検体から確認された HI 価も 10 倍と低値であった。

3.2 エンテロウイルス不活化効果の検討(表 2)

3.2.1 動物試験結果

1 LD₅₀ における死亡率は、対照群 46.0% (40/87) に対して乳清添加群 19.6% (18/92) であった。10 LD₅₀ における死亡率は、対照群 89.6% (69/77) に対して乳清添加群 14.8% (12/81) であり、両濃度において乳清添加群で死亡率が低い結果となった。また、ウイルス量を 10 倍にすると対照群では致死率が上昇したのに対して、乳清添加群では変化は見られなかった。なお、生存個体中に後脚の弛緩性麻痺や著しい哺乳低下といった感染の兆候を示す個体は確認されなかった。

3.2.2 細胞培養試験結果

1 TCID₅₀ における CPE 出現率は、対照群 62.5% (5/8) に対して乳清添加群 23.9% (22/92) であった。10 TCID₅₀ における CPE 出現率は、対照群 87.5% (7/8) に対して乳清添加群 54.3% (50/92) であった。

4. 考察

ウシの早期初乳についてインフルエンザウイルスに対する HI 試験を実施したところ、対象となる型によって大きく異なる結果が得られた。AH3 型に対しては、23 頭全ての分娩後 1 日目の検体で HI 価が確認され、うち 8 検体は HI 価 80 倍とワクチン株由来抗血清に匹敵するような値を示した。一方で、他の 2 型に対する反応性は乏しく、とりわけ B 型に対しては HI 価を示したのは 4 頭 7 検体のみと AH3 型と比較して著しく劣る結果であった。ウシに対する A 型および B 型インフルエンザウイルスの感染性は未だ確認されていないことから、今回得られた HI 価は

抗体ではなく、ラクトフェリン⁴⁾や酸性ミルクオリゴ糖⁵⁾等の乳清成分によるものであったと推察される。これら成分の各型に対する反応性は非特異的であると考えられるが、今回の検討では型間で異なる反応性を示した。検討条件として各型の血球凝集能を 16 HA 単位に統一していたが、株により血球凝集能には差があることから、調整したウイルス溶液中に実際に含まれていたウイルスの量そのものは、型によりそれぞれ異なっていたと推測される。したがって、各型間の反応性の違いは反応対象であるウイルス量に起因したものであった可能性が高いと考えられた。HI 試験は本来、ウイルスの性状解析やヒトの血中抗体価測定等を目的とした手法であるため、手指汚染の想定よりもはるかに多いウイルス量で検討を行った。それにも関わらず、型により差は見られたものの HI 価が確認されたことから、手指汚染で想定される少ないウイルス量においては、十分に不活化効果が期待できるものと考えられた。

エンテロウイルスに対する中和試験では、in vivo にあたるマウスを用いた動物試験、in vitro にあたる細胞培養試験の両法において、それぞれ死亡率、CPE 出現率の低下が認められた。このことから、乳清のエンテロウイルスに対する不活化効果が確認されたと考える。

早期初乳を添加剤とすることで手指用衛生用品にウイルス不活化効果を付加することが出来れば、間接接触感染の簡便な予防対策として活用し得るだけでなく、現在は廃棄処分されている膨大な資源の有効活用にも繋がる。今後も間接接触感染によって感染が拡大する他のウイルスに対する効果等、実現化に向けた更なる検討を重ねていきたい。

参考文献

- 1) 牛島廣治, 大楽真健, 本間仁, 他: ウシ初乳中の免疫グロブリン成分—特に抗ロタウイルス抗体—の基礎的研究, 感染症学雑誌, **64**, 3, 1990, 274-279.
- 2) 牛島廣治, 大楽真健, 向山淳司: ウシ初乳の静菌作用, 感染症学雑誌, **65**, 1, 1991, 54-60.
- 3) 国立感染症研究所: インフルエンザ診断マニュアル (第 2 版), 2012, 17-24.
- 4) Pietrantoni A., Dofrelli E., Tinari A., et al.: Bovine lactoferrin inhibits influenza A virus induced programmed cell death invitro, *Biometals*, **23**, 3, 465-475.
- 5) 内田健志, 北郡秀晃, 山口博史, 他: ウシ初乳中酸性ミルクオリゴ糖のインフルエンザウイルス感染阻害作用, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2011, 81.